植物分类与资源学报 2015, 37 (5): 611~615
Plant Diversity and Resources DOI: 10.7677/ynzwyj201515012

白旗兜兰种子非共生萌发与试管苗快速繁育*

陈 莹[1,2], 范旭丽[1], 高江云[1**]
(1 中国科学院西双版纳热带植物园综合保护中心, 云南 勐腊 666303; 2 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 对我国极小种群野生植物白旗兜兰的种子非共生萌发与试管苗快速繁育开展研究, 对比了不同培养基、预处理、种子成熟度及光照对种子萌发的影响。白旗兜兰种子萌发的最适条件是授粉后 270 d 的种子, 在 1/4MS+10%椰汁培养基上, 用 1% NaOCl 溶液处理种子 40 min 并在播种后的前 4 周进行黑暗培养。最适合原球茎转化幼苗的培养基是 3.0 g·L^{-1}花宝一号+1.0 mg·L^{-1} NAA+0.5 g·L^{-1}活性炭+10%香蕉匀浆, 而最佳幼苗生根壮苗的培养基是 3.0 g·L^{-1}花宝一号+1.0 mg·L^{-1} NAA+1.0 mg·L^{-1} 6-BA+0.5 g·L^{-1}活性炭+10%香蕉匀浆。
关键词: 白旗兜兰; 种子非共生萌发; 极小种群物种; 兰科植物保护; 试管苗快繁
中图分类号: Q 945 **文献标志码**: A **文章编号**: 2095-0845(2015)05-611-05

Asymbiotic Seed Germination and *in vitro* Seedling Rapid Development of *Paphiopedilum spicerianum*

CHEN Ying[1,2], FAN Xu-li[1], GAO Jiang-yun[1**]
(1 *Center for Integrative Conservation*, *Xishuangbanna Tropical Botanical Garden*, *the Chinese Academy of Sciences*, Mengla, Yunnan 666303, China; 2 *University of Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100049, China)

Abstract: In this paper, we studied the asymbiotic seed germination and seedling development of *Paphiopedilum spicerianum*, a wild plant with extremely small populations (PSESP) in China. By analogizing the influences of different media, seed maturity, pretreatments and lights on the seed germination, the results showed that the best germination condition is using the seeds at 270 days after pollination, pretreating with 1% NaOCl for 40 min, on the 1/4MS+10% coconut water medium under 24 hours darkness for 4 weeks. For seedling formation, 3.0 g·L^{-1} Hyponex No 1 medium with 1.0 mg·L^{-1} α-naphthlene acetic acid, 0.5 g·L^{-1} activated charcoal and 10% banana homogenate was the most effective. For seedling development, the same medium used for seedling formation with supplemented 1.0 g·L^{-1} 6-benzyladenine was most suitable.
Key words: *Paphiopedilum spicerianum*; Asymbiotic seed germination; Wild Plants with Extremely Small Populations; Orchid conservation; *in vitro* seedling rapid production

我国目前唯一已知的白旗兜兰（*Paphiopedilum spicerianum*）种群, 是 2003 年在云南省普洱市发现的仅残留 10 余株的成年植株（叶德平和罗毅波, 2006）。该种群生长在一个外来移民村村口小河沟边陡峭的河岸上（图 1: A）, 此处土质松软, 河岸极易因大雨冲刷或小河涨水而崩塌, 小河周围是咖啡种植园, 河水已被咖啡加工厂的废料严重污染, 其生长环境十分恶劣。目前白旗兜兰已被列入由国家林业局和国家发改委联合印发的《全国极小种群野生植物拯救保护工程规划（2011-2015 年）》目录中。鉴于白旗兜兰现状, 就地保护（*in situ* conservation）已经很难对现有种群进行有效保护, 在开展迁地保护（*ex situ* conservation）的基础上, 通过人工扩繁种苗,

* 基金项目: 国家自然科学基金（31470450）
** 通讯作者: Author for correspondence; E-mail: gjy@xtbg.org.cn
收稿日期: 2015-01-22, 2015-05-12 接受发表
作者简介: 陈莹（1988-）女, 硕士研究生, 主要研究兰科植物种子的非共生萌发与组培扩繁。

再进行野外回归（*reintroduction*）是拯救白旗兜兰的唯一途径。

兜兰属是兰科中种子非共生萌发最为困难的属之一，种子无菌萌发技术难度较大（Arditti 和 Ernst, 1993）。但在本研究中我们将对白旗兜兰种子非共生萌发、原球茎转化幼苗以及幼苗生根壮苗方面开展系统的研究，以获得白旗兜兰种苗快速扩繁的完整技术，为开展白旗兜兰的回归奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

白旗兜兰（*Paphiopedilum spicerianum*（Rchb. f.）Pfitzer）为地生或半附生兰科植物，花期为10–12月（图1：B）。本研究所用的白旗兜兰种子来自迁地保护于中国科学院西双版纳热带植物园的5株白旗兜兰植株，于2012年11月17日进行人工异交授粉，分别在授粉后不同时期采集成熟度不同的蒴果。

1.2 方法

采集的蒴果放入无水氯化钙的干燥器内，一天后取出，经常规消毒后，用无菌滤纸擦拭干净，纵向切开蒴果，取出种子待用。根据相关文献，选取1/4MS（大量元素化合物的用量降低至1/4，其余不变，其中蔗糖30 g·L^{-1}；Murashige 和 Skoog, 1962）、1/4MS+100 ml·L^{-1}椰子汁（MSCW）、RE（其中果糖20 g·L^{-1}；Arditti, 1982）和RE+100 ml·L^{-1}椰子汁（RECW）4种培养基进行种子萌发的预实验，播种30天后，按兰科植物种子萌发和原球茎发育常用分级方法统计种子萌发率（Stewart 和 Zettler, 2002）。

1.2.1　培养基、种子成熟度、种子预处理和光照对种子萌发率的影响　培养基为预实验时筛选出的具有较高种子萌发率的MSCW和RECW培养基；采集授粉后180、270和360 d的蒴果；将每次获得的种子平均放入到4个针管内，吸取8 mL 1% NaOCl溶液，分别浸泡5、40、60和80 min，然后用无菌水清洗5次，再将针管内的种子分别打入4瓶无菌悬浮液（1 g·L^{-1}（琼脂/纯水））里混匀，用无菌移液枪吸取1 mL的种子悬浮液放入培养瓶播种，封口后分为2组，一组先在黑暗条件下培养4周，另一组直接在12/12 h（光照/黑暗）光周期（荧光灯200 μmol m^{-2} s^{-1}）下进行生长。播种90 d后统计每瓶培养基内种子的萌发率（萌发率（%）=（每瓶萌发的种子数/每瓶的播种量）×100%）。根据兰科植物种子萌发常用的标准，当种胚膨大，产生根状物即视为萌发（Arditti, 1967）。

1.2.2　不同培养基对白旗兜兰原球茎转化幼苗的影响

播种100 d后将绿色健康原球茎移栽到以下4种不同培养基内，观察不同添加物对原球茎转化幼苗的影响。（1）1/2MS+0.2 mg·L^{-1} IBA+2.0 g·L^{-1}活性炭；（2）3.0 g·L^{-1}花宝一号（美国花宝公司）+1.0 mg·L^{-1} NAA+0.5 g·L^{-1}活性炭+10%香蕉匀浆；（3）MS+1.0 mg·L^{-1} NAA+0.2 mg·L^{-1} IBA+0.5 g·L^{-1}活性炭+10%香蕉匀浆；（4）2.0 g·L^{-1}花宝一号+2.0 g·L^{-1}蛋白胨+1.0 mg·L^{-1} NAA+1.0 g·L^{-1}活性炭+10%香蕉匀浆。每个培养瓶内转移10个健康的原球茎，每个处理重复10次。三个月后统计幼苗的形成情况，以长出嫩叶芽为标准。

1.2.3　不同培养基对白旗兜兰幼苗生根壮苗的影响

将得到的幼苗转移到加有6种不同添加物的培养基中，观察幼苗长叶和生根的情况（表3）。每瓶移栽3棵，每个处理重复8次，4个月后测量每瓶内最大植株的最长叶的叶长生长率（叶长生长率（%）=（最终测量的叶长长度–最初测量的叶长长度/最初测量的叶长长度）×100%）（张铭光等, 1994）以及生根状况（以生根的数量评估：0条为差；1~2条为中；3~5条为好），来评估最适合幼苗生长的培养基。

1.3 数据分析

种子的萌发率用广义线性模型（Sileshi, 2012）和二项分布函数对4个因素的影响进行处理，并用Tukey检验来对各个处理内的影响进行多重比较；植株生长速率用一般线性混合模型来处理，并用Tukey检验中的单一自由度来比较不同培养基对植株生长的影响，所有数据都在3.1.1版本的R统计软件中进行分析。

2 实验结果

2.1 培养基、成熟度、预处理和光照对种子萌发率的影响

表1数据表明，培养基、成熟度、预处理和光照4个因素对白旗兜兰种子的萌发都有极显著的影响，其中预处理的作用最大，其次是成熟度，培养基和光照。

黑暗处理能促进授粉后270 d和360 d时种子的萌发，但是对于前者效果不显著，对于后者则有显著效果；而授粉后180 d时的种子，其萌

表1　培养基、种子成熟度、种子预处理和光照对白旗兜兰种子萌发率的影响

Table 1　The effects of different treatments of media, seed maturity, seed pretreatments and lights on seed germination of *Paphiopedilum spicerianum*

因素 Factor	萌发 Germination
光照（*df*=1）Light	239.6***
培养基（*df*=1）Media	4627.4***
成熟度（*df*=2）Maturity	4627.4***
预处理（*df*=3）Pretreatment	5431.8***

*** $P<0.0001$; ** $P<0.01$; * $P<0.05$; *df* 为自由度

发率几乎为零，黑暗处理对其萌发没有显著作用（图 2：A）。40 min 的预处理能显著提高种子的萌发率（25.66 ± 2.28）%，60 min（8.36 ± 1.27）% 与 5 min（8.04 ± 1.18）%预处理之间种子的萌发率没有显著差异，80 min 预处理时萌发率最低（0.22 ± 0.10）%（图 2：B）与其他三个处理间有显著差异。

从种子成熟度来看，授粉后 270 d 时采集的种子萌发率最高（17.72 ± 2.00）%，但是与 360 d（13.29 ± 1.25）%之间没有显著性差异，而 180 d 时采集的种子萌发率最低（0.48 ± 0.07）%（图 2：C）。培养基对授粉后 180 d 时采集的种子的萌发率没有显著影响，但对 270 d 和 360 d 的种子有显著性影响，RECW 培养基里的种子萌发率明显比 MSCW 培养基里的高（图 2：D）；但 RECW 培养基上形成的原球茎为白色，继续培养会褐化死亡（图 1：C：a），而 MSCW 培养基里的原球茎健康（图 1：C：b）。

2.2　白旗兜兰原球茎转化幼苗及生根壮苗

在 4 种原球茎转化幼苗的培养基中，只有 2 号培养基中原球茎顺利转化成幼苗，且幼苗生长良好（图 1：E），其他 3 种培养基中的原球茎或形成的幼苗都在后期褐化死亡（图 1：D）。

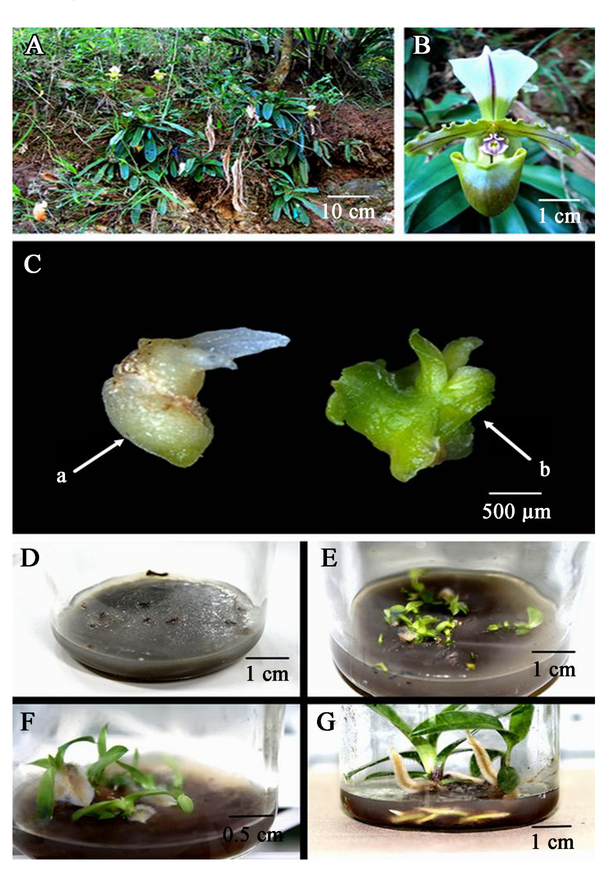


图 1　白旗兜兰的生境、花和种子非共生萌发体系。A. 白旗兜兰的生境；B. 白旗兜兰的花；C. 不同培养基中形成的原球茎；D. 褐化死亡的幼苗；E. 健康的幼苗；F. 形成的幼根；G. 健壮的根。a. RECW 培养基中形成的白色原球茎；b. MSCW 培养基中形成的健康绿色原球茎

Fig. 1　The habitat, flower and seed asymbiotic germination system of *P. spicerianum*. A. The habitat of *P. spicerianum*; B. The flower of *P. spicerianum*; C. The protocorms in different media; D. The dead seedlings; E. The healthy seedlings; F. The radicles; G. The big roots. a. The white protocorm in RECW medium; b. The healthy protocorm in MSCW medium

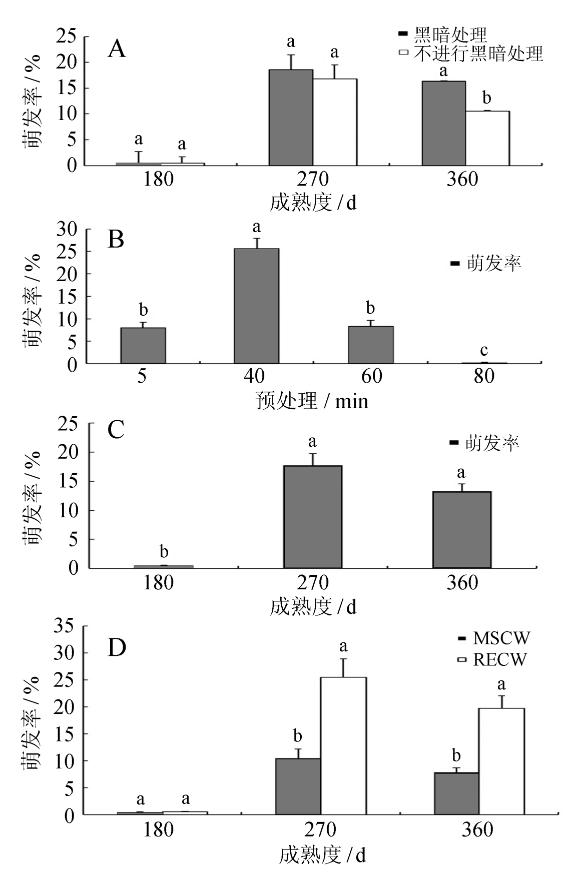


图 2　光照、种子预处理、种子成熟度和培养基对白旗兜兰种子萌发率的影响。A：不同成熟度时光照处理对种子萌发率的影响；B：种子预处理对种子萌发率的影响；C：种子成熟度对种子萌发率的影响；D：不同成熟度时培养基对种子萌发率的影响。不同小写字母代表差异显著（$P < 0.05$）

Fig. 2　The effects of different treatments of lights, pretreatments, seed maturity and media on seed germination ratios of *P. spicerianum*. A. The effects of lights on seed germination in different maturity; B. The effects of pretreatments on seed germination; C. The effects of seed maturity on seed germination; D. The effects of media on seed germination in different maturity. Different letters on column present significant difference（$P < 0.05$）

白旗兜兰幼苗移植4个月后，在6种培养基中，HYPO4、MS_NAAO和HYPO3培养基中的幼苗生长显著快于其他3种培养基，在HYPO4培养基上的叶长生长率最快（283±29）%，而在HYPO2培养基上的叶长生长率最慢（表2）。另外，花宝培养基中幼苗叶子的颜色都呈绿色，而在MS培养基中的幼苗叶颜色发黄，6种培养基中幼苗的根都生长良好，每个幼苗均生长出3条以上根（图1：F，G；表2）。

3 讨论

在预实验中我们发现添加椰汁能够有效促进种子的萌发，这可能与椰汁中富含玉米素等植物生长调节剂有关（曾宋君等，2007）。王莲辉等（2009）在研究长瓣兜兰（*P. dianthum*）时也发现添加100 ml·L^{-1}的椰汁能够有效促进种子萌发，与我们的研究结果相似。光照能显著影响兜兰属种子的萌发，黑暗处理的时间长短能影响彩云兜兰（*P. wardii*）的种子萌发，45 d的黑暗处理时种子萌发率最高（Zeng等，2012），在我们的研究中，黑暗处理能显著促进白旗兜兰种子的萌发，这可能与白旗兜兰的地生习性有关，种子播种后，必须经历类似土壤中的黑暗环境才能萌发。用NaOCl溶液对种子进行预处理可以提高兰科种子的萌发率，NaOCl可以破坏种皮，增加种皮的渗透性或消除一些抑制物质（Rasmussen，1995；Lee等，2007）。在该研究中，白旗兜兰的种子在预处理40 min时萌发率最高（图2：B）。培养基也影响兜兰属种子的萌发（刘其府等，2012；Nhut等，2005）。Long等（2010）在研究4种兜兰时发现，种子的萌发率在KC培养基上最高；陈之林等（2004）研究杏黄兜兰（*P. armeniacum*）和硬叶兜兰（*P. micranthum*）时发现在R培养基上的萌发率最高，但部分萌发的种子出现褐死现象，这与我们的研究结果相似。种子的成熟度也对种子的萌发率有很大影响，研究发现未成熟的种子比成熟的种子更好萌发，因为种子在成熟期间种皮上的覆盖物会越来越多导致种子的不透水性增加（Ramsay和Stewart，1998；Kauth等，2008），或是完全成熟的种子进入休眠或产生某些抑制种子萌发的物质（陈之林等，2004）。

在原球茎转化成幼苗阶段，我们发现与MS培养基相比，花宝培养基更适合幼苗形成和生长。曾宋君等（2006）在研究带叶兜兰（*P. hirsutissimum*）时用了3种培养基进行原球茎分化和成苗诱导，发现1.5 g·L^{-1}花宝1号+1.5 g·L^{-1}花宝2号+2 g·L^{-1}活性炭+2.0 mg·L^{-1} 6-BA+0.2 mg·L^{-1} NAA培养基上的形成的幼苗最为健壮。

不同的培养基会显著影响幼苗的生长。本研究中，与MS培养基相比，花宝1号培养基里的幼苗生长得更好；Dutra等（2009）研究*Cyrtopodium punctatum*时发现，在初始阶段KC培养基上的幼苗生长最好，而到了后期P723培养基则最适合幼苗生长。另外，幼苗的生长也受到添加物的影响，在该研究中，香蕉匀浆对幼苗的生长有促进作用，这在其他研究中也有发现（曾宋君等，2006；周丽等，2012）。植物激素对促进兰科植物幼苗的生长具有重要作用，但不同的植物种类最适合的植物激素浓度也不相同（Roy等，2011；Abraham等，2012；Suzuki等，2012；Bektas等，2013）。在该研究中添加1.0 mg·L^{-1} NAA和1.0 mg·L^{-1} 6-BA时白旗兜兰幼苗生长最好，同时在所用的6种培养基中植株的根都生长良好（表3）。

本研究筛选出了极小种群植物白旗兜兰种子非共生萌发的最适培养基，并对培养基、种子成熟度、种子预处理和光照对白旗兜兰种子萌发率

表2 不同培养基对白旗兜兰幼苗生长和生根的影响

Table 2 The effects of different media on seedling development and root formation of *Paphiopedilum spicerianum*

缩写 Abbreviation	培养基组成 Media content	叶长生长率 Leaf length growth rate/%	生根状况 Roots
HYPO1	3.0 g·L^{-1}花宝一号+0.5 mg·L^{-1} NAA+1.0 g·L^{-1}活性炭	158±16^{b}	好
HYPO2	3.0 g·L^{-1}花宝一号+2.0 mg·L^{-1} 6-BA+0.5 mg·L^{-1} NAA+1.0 g·L^{-1}活性炭	91±13^{b}	好
HYPO3	3.0 g·L^{-1}花宝一号+3.0 g·L^{-1}蛋白胨+0.2 mg·L^{-1} NAA+2.0 mg·L^{-1} 6-BA+1 g·L^{-1}活性炭	166±19^{ab}	好
HYPO4	3.0 g·L^{-1}花宝一号+1.0 mg·L^{-1} NAA+1.0 mg·L^{-1} 6-BA+0.5 g·L^{-1}活性炭+10%香蕉匀浆	283±29^{a}	好
MS_NAAO	MS+0.2 mg·L^{-1} NAA+2.0 mg·L^{-1} 6-BA+2.0 g·L^{-1}活性炭	144±26^{ab}	好
MS_IBAO	MS+0.2 mg·L^{-1} IBA+0.2 mg·L^{-1} 6-BA+2.0 g·L^{-1}活性炭	174±16^{b}	好

的影响进行了综合研究，同时优化了幼苗生根壮苗的培养基和培养条件，把白旗兜兰的种子萌发、幼苗形成到幼苗的健壮生长整个过程减缩到一年，实现了白旗兜兰种苗快速扩繁的目的，形成了较为完善的白旗兜兰种子非共生萌发和种苗快速扩繁的技术体系，为极小种群物种白旗兜兰的有效保护提供了技术支撑，同时也为其他兜兰属植物的种子非共生萌发和种苗扩繁提供了借鉴。

〔参　考　文　献〕

Abraham S, Augustine J, Thomas TD, 2012. Asymbiotic seed germination and in vitro conservation of *Coelogyne nervosa* A. Rich. an endemic orchid to Western Ghats [J]. *Physiologicaland Molecular Biology of Plants*, **18** (3): 245—251

Arditti J, 1967. Factors affecting the germination of orchid seeds [J]. *Botanical Review*, (33): 1—97

Arditti J, 1982. *Orchid Biology*, *Reviews and Perspective* Ⅱ [M]. Ithaca, NY: Cornell University Press, 352

Arditti J, Ernst R, 1993. *Micropropagation of Orchids* [M]. New York: John Wiley and Sons

Bektas E, Cuce M, Sokmen A, 2013. *In vitro* germination, protocorm formation, and plantlet development of *Orchis coriophora* (Orchidaceae), a naturally growing orchid species in Turkey [J]. *Turkish Journal of Botany*, (37): 336—342

Chen ZL (陈之林), Ye XL (叶秀粦), Liang CY (梁承邺), 2004. Seed germination *in vitro* of *Paphiopedilum armeniacum* and *P. micranthum* [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), **31** (4): 540—542

Dutra D, Kane ME, Richardson L, 2009. Asymbiotic seed germination and in vitro seedling development of *Cyrtopodium punctatum*: a propagation protocol for an endangered Florida native orchid [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, (96): 235—243

Kauth P, dutra D, Johnson T, 2008. Techniques and applications of in vitro orchid seed germination [A]// Teixeira da Silva JA ed., *Floriculture*, *Ornamental and Plant Biotechnology*: *Advances and Topical Issues* [M]. Global Science Books, UK, 375—391

Lee YI, Lu CF, Chung MC *et al.*, 2007. Changes in endogenous abscisic acid levels and asymbiotic seed germination of a terrestrial orchid, *Calanthe tricarinata* Lindl [J]. *Journal of the American Society for Horticulture Science*, (132): 246—252

Liu QF (刘其府), Fu YY (傅燕艳), Zeng SJ (曾宋君), 2012. Test on asymbiotic seed germination of *Paphiopedilum concolor* (Bateman) Pfitz. [J]. *Guangdong Agricultural Sciences* (广东农业科学), **39** (12): 47—49

Long B, Niemiera A, Cheng Z *et al.*, 2010. In vitro propagation of four threatened *Paphiopedilum* species (Orchidaceae) [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, (101): 151—162

Murashige T, Skoog F, 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture [J]. *Physiologia Plantarum*, (15): 473—497

Nhut D, Trang P, Vu N *et al.*, 2005. A wounding method and liquid culture in *Paphiopedlium delenatii* propagation [J]. *Propagation of Ornamental Plants*, (5): 156—161

Ramsay M, Stewart J, 1998. Re-establishment of the lady's slipper orchid (*Cypripedium calceolus* L.) in Britain [J]. *Botanical Journal of the Linnean Society*, (126): 173—181

Rasmussen HN, 1995. *Terrestrial Orchids from Seed to Mycotrophic Plant* [M]. New York: Cambridge University Press

Roy AR, Patel RS, Patel VV *et al.*, 2011. Asymbiotic seed germination, mass propagation and seedling development of *Vanda coerulea* Griff ex. Lindl. (Blue Vanda): An *in vitro* protocol for an endangered orchid [J]. *Scientia Horticulturae*, (128): 325—331

Sileshi G, 2012. A critique of current trends in the statistical analysis of seed germination and viability data [J]. *Seed Science Research*, (22): 145—159

Stewart SL, Zettler LW, 2002. Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida [J]. *Aquatic Botany*, (72): 25—35

Suzuki RM, Moreira VC, Pescador R *et al.*, 2012. Asymbiotic seed germination and *in vitro* seedling development of the threatened orchid *Hoffmannseggella cinnabarina* [J]. *In Vitro Cellular Developmental Biology-Plant*, (48): 500—511

Wang LH (王莲辉), Jiang YL (姜运力), Yu JY (余金勇) *et al.*, 2009. Tissue culture and rapid propagation of *Paphiopedilum dianthum* Tang et Wang [J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), **45** (9): 887—888

Ye DP (叶德平), Luo YB (罗毅波), 2006. *Paphiopedilum spicerianum*, a new record of Orchidaceae from China [J]. *Acta Phytotaxonomica Sinica* (植物分类学报), **44** (4): 471—473

Zeng SJ (曾宋君), Chen ZL (陈之林), Duan J (段俊), 2006. Asepsis sowing and *in vitro* propagation of *Paphiopedilum hirsutissimum* Pfitz [J]. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), **42** (2): 247—247

Zeng SJ (曾宋君), Chen ZL (陈之林), Wu KL (吴坤林) *et al.*, 2007. A Resume of Germination and Mericlone of *Paphiopedilum* [J]. *Acta Horticulturae Sinica* (园艺学报), **34** (3): 793—796

Zeng SJ, Wu KL, Teixeira SJ *et al.*, 2012. Asymbiotic seed germination, seedling development and reintroduction of *Paphiopedilum wardii* Sumerh., an endangered terrestrial orchid [J]. *Scientia Horticulturae*, (138): 198—209

Zhang MG (张铭光), Pan RZ (潘瑞炽), Ye QS (叶庆生), 1994. Influence of moisture on leaf growth and photosynthetic rate of *Cymbidium sinense* [J]. *Journal of South China Normal University* (华南师范大学学报), (2): 72—75

Zhou L (周丽), Li SK (李松克), Deng KY (邓克云) *et al.*, 2012. Aseptic sowing and tissue culture propagation of *Paphiopedilum gratrixianum* [J]. *Journal of Anhui Agriculture Science* (安徽农业科学), **40** (18): 9590—9592